

Rec'd PCT/PTO 21 JAN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

521,947

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年1月29日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/009800 A1

(51) 国際特許分類7: C12N 1/20, A23K 1/16, A23L 1/30, A61K 35/74, 47/36, A61P 1/00, 1/04, 1/10, 1/14, 1/16, 3/00, 3/06, 9/12, 13/02, 29/00, 31/00, 31/18, 35/00, 37/02, 37/04, 37/08, 39/06, 43/00 // C12N 1/38

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009272

(22) 国際出願日: 2003年7月22日 (22.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-212336 2002年7月22日 (22.07.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 名糖産業株式会社 (MEITO SANGYO CO., LTD) [JP/JP]; 〒451-8520 愛知県名古屋市西区 笹塚町2丁目41番地 Aichi (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 安田 勲司 (YASUDA,Kenji) [JP/JP]; 〒503-0888 岐阜県大垣市丸の内2丁目50番地 パーサージュ大垣902 Gifu (JP). 小川 知彦 (OGAWA,Tomohiko) [JP/JP]; 〒561-0884 大阪府 豊中市岡町北1-1-8 Osaka (JP). 長谷川 正勝 (HASEGAWA,Masakatsu) [JP/JP]; 〒457-0847 愛知県名古屋市南区道徳新町5-29 Aichi (JP).

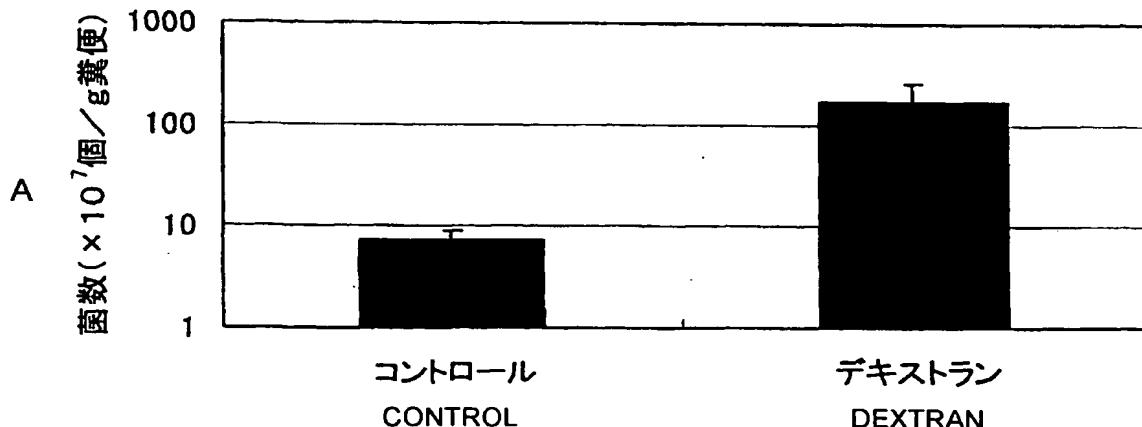
(74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI,Yoshiyuki et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING THE PROLIFERATION OF *LACTOBACILLUS CASEI* SUBSP. *CASEI*

(54) 発明の名称: ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイ 増殖促進用組成物



A...BACTERIAL COUNT (X10<sup>7</sup>/g FECES)

WO 2004/009800 A1

(57) Abstract: A dextran-containing composition for promoting bacterial proliferation which aims at selectively proliferating *L. casei* subsp. *casei*. By using this composition, *L. casei* subsp. *casei* can be selectively proliferated and fixed in the intestines of human or animals without taking *L. casei* subsp. *casei* as needed. It is also possible thereby to selectively grow and proliferate indigenous *L. casei* subsp. *casei* in the intestine. Thus, various biological activities of *L. casei* subsp. *casei* can be sustained *in vivo*.

(57) 要約: 本発明は、*L. casei* subsp. *casei* を選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物である。本発明により、*L. casei* subsp. *casei* を随時摂取しなくとも、*L. casei* subsp. *casei* をヒトや動物等の腸内で選択的に発育増殖・定着させることで、また腸内に常在する *L. casei* subsp. *casei* を腸内で選択的に発育増殖させることで、*L. casei* subsp. *casei* 由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させることができる。



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

## 明細書

## ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイ増殖促進用組成物

## 技術分野

本発明は、種々の生物学的活性を有する乳酸菌の1種であるラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイ (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*) (以下、「*L. casei* subsp. *casei*」と略記する。) を選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物、及び、さらに *L. casei* subsp. *casei* を含む該菌増殖促進用組成物に関する。より具体的には、本発明は該菌増殖促進用組成物を含む生物学的活性を高めるための医薬組成物、並びに該菌増殖促進用組成物を含む生物学的活性を高めるための健康用食品及び飼料に関する。

## 背景技術

近年プロバイオティックスと呼ばれ、生きた乳酸菌等の有用微生物からなる「微生物製剤」を整腸効果や感染症の防止、免疫賦活等を目的として摂取することが注目されている。しかしながら、その有用微生物がヒトや動物等の腸内で生育・定着できるかが疑問視されている。有用微生物が腸内で生育・定着できなければ、期待されるその有用微生物の持つ生物学的活性が持続的に得られないことになる。それを補うための対策としては、その微生物製剤を隨時補給する事が提唱・実行されているのが実情である。一方、プロバイオティックスに含まれる有用微生物が資化できるオリゴ糖等をプレバイオティックスと呼び、またそれをプロバイオティックスと一緒にしたものシンバイオティックスと呼び、それらもまた、上記目的のために、ヒトや動物等に投与されている。しかしながら、そのプレバイオティックスがかなり多くの目的とする菌以外の腸内細菌に資化される場合には、腸内でそのプレバイオティックスの奪い合いになり目的の有用微生物を選択的に生育・定着させることは難

しい。

## 発明の開示

本発明は、プロバイオティックスと呼ばれている有用微生物をヒトや動物等に摂取させた後に、これらの有用微生物を隨時補給しなくとも、腸内で選択的に発育増殖・定着させることで、また腸内に常在する有用微生物を腸内で選択的に発育増殖させることで、有用微生物由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させることを課題とする。

本願発明者らは、数ある有用微生物の中で、デキストランを資化して発育増殖することが出来る菌種として、*L. casei* subsp. *casei* を生体外 (in vitro) 試験において見出した。その *L. casei* subsp. *casei* は、アプループドリスト (Approved Lists) (1980) において分類・命名されているものである。この菌はヒトや動物等の腸内にも常在するグラム陽性の通性嫌気性桿菌であり、他の菌と共に腸内細菌叢を形成している。

そこで、まず、この菌自体に生物学的活性、1例として皮下免疫の際の免疫賦活作用が存在するかどうかを確認したところ、体液性免疫及び細胞性免疫を増強・維持することができた。次に、デキストランを経口摂取させることで、*L. casei* subsp. *casei* をヒトや動物等の腸内で選択的に発育増殖・定着させ、その菌の有する生物学的活性を持続させることができるかどうかを確認するために、マウスを用いて初回のみに *L. casei* subsp. *casei* を投与し、その後、デキストランをマウスに経口で継続的に摂取させたところ、本菌はデキストランを資化して腸内で発育増殖・定着し、その菌の有する生物学的活性、例えば、体液性免疫及び細胞性免疫を増強・維持することを生体内 (in vivo) 試験において見出すに至った。

他方、デキストラン自身にも種々の生物学的活性を有することが知られているが、デキストラン単独投与に比べ、デキストランを *L. casei* subsp. *casei* と併行投与した場合は、高い効果が維持され、相乗効果が大きい事が確認された。

本発明は、以上のようにして達成された。本発明の要旨は、以下のとおりである。

- (1) ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物。
- (2) さらに、ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを含む(1)に記載の菌増殖促進用組成物。
- (3) デキストランの分子量が2,000～4,000万である(1)に記載の菌増殖促進用組成物。
- (4) (1)～(3)のいずれかに記載の菌増殖促進用組成物を含む医薬組成物。
- (5) (1)～(3)のいずれかに記載の菌増殖促進用組成物を含む健康用食品。
- (6) (1)～(3)のいずれかに記載の菌増殖促進用組成物を含む飼料。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、マウス糞便中の *L. casei* subsp. *casei* 菌数に与えるデキストランの影響を示す図である。

第2図は、抗原経口投与における体液性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

第3図は、抗原経口投与における細胞性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

第4図は、抗原皮下投与における体液性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

第5図は、抗原皮下投与における細胞性免疫のデキストランによる増強の結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の組成物は、*L. casei* subsp. *casei* を選択的に増殖させるた

めの、デキストランを含む菌増殖促進用組成物、及び、さらに *L. casei* subsp. *casei* を含む該菌増殖促進用組成物である。本発明の組成物に用いられるデキストランは、当業者によく知られた通常の方法により合成、調整等を行うことが可能である。また、本発明に用いられる *L. casei* subsp. *casei* の培養、菌体の調製・乾燥方法、遺伝子組換え等については、当業者によく知られた通常の方法によって行うことができる。

(本発明に用いられるデキストランの説明)

デキストランは  $\alpha$  1, 6 結合を主体としたグルコースの多糖体である。本発明に用いられるデキストランとしては、例えば、市場で入手したもの用いてもよく、または、リューウコノストク (*Leuconostoc*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属からなる群より選ばれる細菌、例えば、リューウコノストク・メゼンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) 等を、通常の培養条件にて、例えば、ショ糖含有栄養培地で培養して得られたものを用いてもよい。

(本発明に用いられるデキストランの分子量)

本発明に用いられるデキストランの分子量としては、分子量が 2, 000 ~ 4, 000 万、好ましくは 4, 000 ~ 500 万、更に好ましくは 4, 000 ~ 200 万である。なお、デキストランの分子量が 2, 000 未満であると、*L. casei* subsp. *casei* 以外の細菌が増殖することがあるため好ましくない。本発明に用いられるデキストランとしては、例えば、上記細菌の培養により得られたデキストランをそのまま、または、更にこれを部分的加水分解処理して適当な分子量のデキストランにしたもの用いることが可能である。

(本発明に用いられる *L. casei* subsp. *casei*)

本発明において *L. casei* subsp. *casei* は、生菌または発育増殖可能な乾燥菌体等の形態で使用することができる。本発明に用いられる *L.*

*casei* subsp. *casei* は、野生型の他、本発明の菌増殖用組成物に含まれるデキストランに対する資化性を損なわない範囲における *L. casei* subsp. *casei* の遺伝子組換え体を用いることもできる。また、*L. casei* subsp. *casei* 由来のデキストラン資化性に関与する遺伝子を他の微生物に導入した遺伝子組換え体を用いることもできる。好ましくは、遺伝子組換え体は、*L. casei* subsp. *casei* に遺伝子組換えによって新たな生物学的活性を発現させた新規微生物、または *L. casei* subsp. *casei* 由来のデキストラン資化性に関与する遺伝子を他の微生物に導入した別の新規微生物である。

本発明の組成物は、*L. casei* subsp. *casei* を選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物、及び、さらに *L. casei* subsp. *casei* を含む該菌増殖促進用組成物である。本発明の組成物は、デキストラン、または、さらに *L. casei* subsp. *casei* を含むこと以外は、当業者によく知られた通常の方法を採用し、調製、投与等をすることが可能である。

#### (本発明の組成物の投与形態)

本発明の組成物は、デキストラン単体、またはデキストランと *L. casei* subsp. *casei* の混合物であってもよいが、好ましくは、これらを製剤学上よく知られた製剤学的に許容し得る希釈剤乃至担体等と組合わせて、デキストランを含む固状、半固状または液状の組成物、または、デキストランと *L. casei* subsp. *casei* を共に加工した固状、半固状または液状の組成物として提供することができる。なお、本発明の組成物とは、本発明のデキストランと *L. casei* subsp. *casei* を組み合わせた形態の他、本発明のデキストランと *L. casei* subsp. *casei* を個別に加工したものを使用時に組み合わせる形態を含む。本発明の組成物における希釈剤乃至担体等の含有量は目的や用法に応じて適宜変化させられ、特に制限されるものではないが、一般的に組成物重量に基づいて約 0.1 ~ 約

99.9重量%、好ましくは約1～約99重量%、更に好ましくは約5～約95重量%の含有量を例示することができる。

尚、液状でデキストランと *L. casei* subsp. *casei* を併存させると、菌の資化によりデキストラン含量が次第に減少していくので、長期間の併存は避ける方が好ましい。そこで、個別に加工・包装し、摂取時に混合するか、個別に摂取することが望ましい。

本発明の医薬組成物は、本発明の組成物単体であってもよいが、好ましくは、これらを薬学上よく知られた薬学的に許容し得る希釈剤乃至担体等と組合わせて、軟カプセル剤、硬カプセル剤、顆粒剤、丸剤、散剤、錠剤、シロップ剤、トローチ剤、エリキシル剤等の如き剤型に調製されたものであってもよい。このような剤型への調製手段は当業者によく知られている。このような剤型への調製において、各剤型に適した薬学上よく知られた薬学的に許容し得る希釈剤乃至担体等を更に含有させることができる。

本発明の医薬組成物を、ヒトや動物等の腸内において *L. casei* subsp. *casei* を選択的に発育増殖・定着させ、または、腸内に常在する *L. casei* subsp. *casei* を腸内で選択的に発育増殖させ、*L. casei* subsp. *casei* 由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させるための医薬として用いることができる。

本発明の医薬組成物の調製において、本発明の組成物の添加量は、下記本発明の組成物の投与量及び投与周期に関する記載を参照して適宜決定することができる。

本発明の健康用食品は、本発明の組成物と、食品や飲料等の組成物を含むものである。なお、本発明の健康用食品とは、本発明の組成物と食品や飲料等の組成物を組み合わせた形態の他、本発明の組成物と食品や飲料等の組成物を個別に加工したものを摂取時に組み合わせる形態を含む。このような食品または飲料組成物としては、例えば、キャンディー、チョコレート、ビスケット等の菓子類、パンや麺類、粉末及び液体等の飲料、ヨーグルト等の乳製品等を挙げることができる。特にヨーグルト

の場合、この *L. casei* subsp. *casei* を使ってヨーグルトを製造することができ、摂取時にデキストランを混合するか、個別に摂取することが望ましい。

本発明の飼料は、本発明の組成物と、家畜・家禽や魚類、ペット等の配合飼料を含むものである。なお、本発明の飼料とは、本発明の組成物と飼料組成物を組み合わせた形態の他、本発明の組成物と飼料組成物を個別に加工したもの摂取時に組み合わせる形態を含む。

本発明の健康用食品または飼料をヒトや動物等の腸内において *L. casei* subsp. *casei* を選択的に発育増殖・定着させ、または、腸内に常在する *L. casei* subsp. *casei* を腸内で選択的に発育増殖させ、*L. casei* subsp. *casei* 由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させるために用いることができる。

本発明の健康用食品及び飼料の調製において、本発明の組成物の添加量は、下記本発明の組成物の投与量及び投与周期に関する記載を参照して適宜決定することができる。

#### (本発明の組成物の投与量及び投与周期)

本発明の組成物の投与量としては、組成物中に含まれるデキストランの投与量として、 $0.01\text{mg} \sim 2\text{g} / \text{kg}$  体重・日、好ましくは $0.1\text{mg} \sim 1\text{g} / \text{kg}$  体重・日、更に好ましくは $1\text{mg} \sim 100\text{mg} / \text{kg}$  体重・日であり、少なくとも本発明のデキストランを含む組成物を通常毎日投与することが好ましい。なお、*L. casei* subsp. *casei* は本来ヒトや動物等の腸内常在菌であるが、*L. casei* subsp. *casei* の生物学的活性の確実な効果を誘導するためには、生菌または発育増殖可能な乾燥菌体を少なくとも1回、好ましくは適当な間隔で投与することが好ましい。また、より確実な効果を誘導するために、毎日投与することもできる。

#### (本発明の組成物の適用対象)

本発明の組成物は、ヒト含む哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類、甲殻類、昆虫等あらゆる生物を対象とすることができます。

(本発明の組成物により付与及び／または向上されることが期待できる生物学的活性)

免疫賦活作用の他、一般的に言われている乳酸菌の有する生物学的活性、例えば、抗腫瘍、血圧降下、抗酸化、抗潰瘍、抗HIV、脂質代謝改善、悪性腫瘍再発抑制、抗炎症、自己免疫疾患予防・抑制、血清コレステロール低下、血糖低下、IgE抗体産生抑制、抗アレルギー、インターロイキン12産生促進、ミネラル吸収促進、ミネラル強化、アルコール吸収代謝調整、尿路感染症予防治療、有害物質産生抑制、整腸、便秘防止、美容、高アンモニア血症や肝性脳症等の治療・防止、感染予防、糞便悪臭抑制、家畜・家禽腸内pH低下、生育向上、肥育促進、及び産卵助長等の作用が期待できる。

### 実施例

以下、本発明を実施例によって、更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### <実施例1> ショ糖を主原料としたデキストランの製造方法

ショ糖を主原料とした培地（ショ糖含有栄養培地）に、乳酸菌の一種である *Leuconostoc mesenteroides* を接種し、25℃、24時間、嫌気性下で培養した後、培養上澄にメタノールを加え、得られた沈殿物を蒸留水に溶解し、不溶物を除いた後に、再度メタノールを加え、得られた沈殿物を蒸留水に再溶解し、噴霧乾燥をしてデキストランを得た。更にこれを部分的加水分解処理してメタノール分画、噴霧乾燥を経て各種分子量のデキストランを得た。

#### <実施例2> 腸内細菌のデキストラン資化性試験

分子量（数平均）10,000のデキストラン（以下の実施例において

も特に規定しない場合はこの分子量のデキストランを用いる)を0.5%添加したPYF培地(ペプトンイーストエキストラクトフィルデス液体培地)(Peptone yeast extract Fildes solution broth)に各種腸内関連細菌を接種し、デキストランの資化性を調べた。その結果、*L. casei* subsp. *casei*の2株(JCM1134及びJCM8129)でデキストランの資化性を確認することができた。しかし、他の*Lactobacillus*属やビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属等の乳酸菌、及び、その他の腸内関連細菌に関しては、デキストランの資化性は見られなかった。

(表1参照)

[表 1-1]腸内関連細菌のデキストラン資化性

| 菌名                       |   | 菌株名        | デキストラン<br>資化性 |
|--------------------------|---|------------|---------------|
| <i>Lactobacillus</i>     | <i>casei</i> subsp. <i>casei</i>            | JCM 1134   | +             |
|                          | <i>casei</i> subsp. <i>casei</i>            | JCM 8129   | +             |
|                          | <i>acidophilus</i>                          | #527       | —             |
|                          | <i>acidophilus</i>                          | JCM 1132   | —             |
|                          | <i>agilis</i>                               | JCM 1187   | —             |
|                          | <i>amylovorus</i>                           | JCM 1126   | —             |
|                          | <i>aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i>      | JCM 5666   | —             |
|                          | <i>brevis</i>                               | JCM 1059   | —             |
|                          | <i>buchneri</i>                             | JCM 1115   | —             |
|                          | <i>casei</i> subsp. <i>alactosus</i>        | JCM 1133   | —             |
|                          | <i>casei</i> subsp. <i>fusiformis</i>       | JCM 1177   | —             |
|                          | <i>casei</i> subsp. <i>plantarum</i>        | JCM 8136   | —             |
|                          | <i>casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>  | JCM 1161   | —             |
|                          | <i>casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>        | JCM 1136   | —             |
|                          | <i>crispatus</i>                            | JCM 1185   | —             |
|                          | <i>curvatus</i>                             | JCM 1096   | —             |
|                          | <i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | JCM 1002   | —             |
|                          | <i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>     | JCM 1248   | —             |
|                          | <i>fermentum</i>                            | JCM 1173   | —             |
|                          | <i>gallinarum</i>                           | JCM 2011   | —             |
|                          | <i>gasseri</i>                              | JCM 1131   | —             |
|                          | <i>johsonii</i>                             | JCM 2012   | —             |
|                          | <i>oris</i>                                 | JCM 11028  | —             |
|                          | <i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>    | JCM 1053   | —             |
|                          | <i>plantarum</i>                            | IFO 3070   | —             |
|                          | <i>reuteri</i>                              | JCM 1112   | —             |
|                          | <i>salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>  | JCM 1150   | —             |
|                          | <i>salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>  | JCM 1231   | —             |
| <i>Clostridium</i>       | <i>butyricum</i>                            | JCM 1391   | —             |
|                          | <i>perfringens</i>                          | JCM 1290   | —             |
| <i>Klebsiella</i>        | <i>pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>  | JCM 1662   | —             |
| <i>Fusobacterium</i>     | <i>varium</i>                               | JCM 3722   | —             |
| <i>Enterococcus</i>      | <i>faecalis</i>                             | JCM 5803   | —             |
|                          | <i>faecium</i>                              | JCM 5804   | —             |
| <i>Eubacterium</i>       | <i>linosum</i>                              | JCM 6421   | —             |
| <i>Propionibacterium</i> | <i>acnes</i>                                | JCM 6425   | —             |
| <i>Bacteroides</i>       | <i>fragilis</i>                             | ATCC 25285 | —             |
| <i>Escherichia</i>       | <i>coli</i>                                 | IFO 3972   | —             |
| <i>Bacillus</i>          | <i>subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>      | IFO 3134   | —             |

[表 1 - 2] 腸内関連細菌のデキストラン資化性

| 菌名   | 菌株名      | デキストラン<br>資化性 |
|--|----------|---------------|
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i>            | JCM 1275 | —             |
| <i>angulatum</i>                               | JCM 7096 | —             |
| <i>animalis</i>                                | JCM 1190 | —             |
| <i>asteroides</i>                              | JCM 8230 | —             |
| <i>bifidum</i>                                 | JCM 1209 | —             |
| <i>bowm</i>                                    | JCM 1211 | —             |
| <i>breve</i>                                   | JCM 1192 | —             |
| <i>catenulatum</i>                             | JCM 1194 | —             |
| <i>choerinum</i>                               | JCM 1212 | —             |
| <i>coryneforme</i>                             | JCM 5819 | —             |
| <i>cuniculi</i>                                | JCM 1213 | —             |
| <i>dentium</i>                                 | JCM 1195 | —             |
| <i>gallicum</i>                                | JCM 8224 | —             |
| <i>gallinarum</i>                              | JCM 6291 | —             |
| <i>indicum</i>                                 | JCM 1302 | —             |
| <i>infantis</i>                                | JCM 1222 | —             |
| <i>longum</i>                                  | JCM 1217 | —             |
| <i>magnum</i>                                  | JCM 1218 | —             |
| <i>mercyicum</i>                               | JCM 8219 | —             |
| <i>minimum</i>                                 | JCM 5821 | —             |
| <i>pseudocatenulatum</i>                       | JCM 1200 | —             |
| <i>pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>     | JCM 5820 | —             |
| <i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> | JCM 1205 | —             |
| <i>pullorum</i>                                | JCM 1214 | —             |
| <i>ruminantium</i>                             | JCM 8222 | —             |
| <i>saeculare</i>                               | JCM 8223 | —             |
| <i>subtile</i>                                 | JCM 5822 | —             |
| <i>suis</i>                                    | JCM 1269 | —             |
| <i>thermophilum</i>                            | JCM 1207 | —             |

更に、*L. casei* subsp. *casei* の 2 株でデキストランの分子量の違いによる資化性を調べた。その結果、試験に供した全ての分子量のデキストランでデキストランの資化性を確認することができた。しかし、分子量が小さい方が資化されやすい傾向があった。(表 2 参照)

[表 2] デキストランの分子量による資化性の違い

| デキストラン    | <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> |          |
|-----------|-------------------------------------|----------|
| 分子量       | JCM 1134                            | JCM 8129 |
| 2,000     | +++                                 | +++      |
| 4,000     | +++                                 | +++      |
| 7,000     | ++                                  | ++       |
| 10,000    | ++                                  | ++       |
| 14,000    | ++                                  | ++       |
| 40,000    | ++                                  | ++       |
| 200,000   | +                                   | +        |
| 2,000,000 | +                                   | +        |

<実施例 3> マウス糞便中の *L. casei* subsp. *casei* 菌数に与えるデキストランの影響

8 週齢の BALB/c 雄マウス 12 匹を 6 匹ずつ 2 群に分けた。各群を(1)コントロール群と(2)デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)には通常食を、(2)にはデキストランを通常食 1 kgあたり 75 mg 添加して与えた。試験開始より 3 日間にわたりどちらの群にも *L. casei* subsp. *casei* をマウス 1 匹あたり  $10^6$  個経口接種した。28 日目に解剖し大腸より採取した糞便をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で段階希釀してデキストラン添加 LB 培地に塗抹し 37°C 48 時間培養して、コロニーをグラム染色で確認した上で、糞便中の *L. casei* subsp. *casei* 菌数を求めた。その結果、デキストラン群の *L. casei* subsp. *casei* 菌数はコントロール群のそれに比べて有意に多かった。

(第1図参照)

＜実施例4＞ 抗原経口投与における体液性免疫のデキストランによる増強

8週齢のBALB/c雄マウス30匹を6匹ずつ5群に分けた。各群は、(1)コントロール群、(2)BSA(牛血清アルブミン)群、(3)BSA+*L. casei* subsp. *casei*群、(4)BSA+デキストラン群、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei*+デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食1kgあたり75mg添加して与えた。試験開始より3日間にわたり(3)と(5)には*L. casei* subsp. *casei*をマウス1匹あたり $10^6$ 個経口接種した。3、4日目に(2)～(5)にはBSAをPBSに10mg/mlの濃度で溶解し、マウス1匹あたり1mg(100μl)経口投与した。33、34日目に(2)～(5)には3、4日目と同様にBSAをマウス1匹あたり1mg経口投与した。その5日後に眼下静脈より採血し、抗BSA抗体価をELISAにより調べた。その結果、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei*+デキストラン群で特異抗体価が有意に高かった。(第2図参照)

＜実施例5＞ 抗原経口投与における細胞性免疫のデキストランによる増強

8週齢のBALB/c雄マウス30匹を6匹ずつ5群に分けた。各群は、(1)コントロール群、(2)BSA群、(3)BSA+*L. casei* subsp. *casei*群、(4)BSA+デキストラン群、(5)BSA+*L. casei* subsp. *casei*+デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食1kgあたり75mg添加して与えた。試験開始より3日間にわたり(3)と(5)には*L. casei* subsp. *casei*をマウス1匹あたり $10^6$ 個経口接種した。3、4日目に(2)～(5)には、BSAをPBSに10mg/mlの濃度で溶解し、マウ

マウス 1 匹あたり 1 mg (100  $\mu$ l) 経口投与した。33、34 日目に(2)～(5)には 3、4 日目と同様に BSA をマウス 1 匹あたり 1 mg 経口投与した。その 5 日後、BSA を PBS に溶解し、マウス耳朶の皮内に投与し、24、48、72 時間後に耳朶の厚みを測定した。その結果、(5) BSA + *L. casei* subsp. *casei* + デキストラン群の耳朶の厚みが有意に増加していた。(第 3 図参照)

＜実施例 6＞ 抗原皮下投与における体液性免疫のデキストランによる増強

8 週齢の BALB/c 雄マウス 30 匹を 6 匹ずつ 5 群に分けた。各群は、(1) コントロール群、(2) BSA 群、(3) BSA + *L. casei* subsp. *casei* 群、(4) BSA + デキストラン群、(5) BSA + *L. casei* subsp. *casei* + デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2) と (3) には通常食を、(4) と (5) にはデキストランを通常食 1 kg あたり 75 mg 添加して与えた。試験開始より 3 日間にわたり (3) と (5) には *L. casei* subsp. *casei* をマウス 1 匹あたり  $10^6$  個経口接種した。3 日目に FIA (フロイント不完全アジュバント) (Freund's incomplete adjuvant) を用いて、それぞれ、(1) には PBS (リン酸緩衝生理食塩水) + FIA、(2)～(5) には BSA 5 mg / ml + FIA をそれぞれ 1 : 1 で乳化させ、1 匹あたり 200  $\mu$ l を足朶の皮下に投与した。35 日目に 3 日目と同様にして追加免疫を行い、その 5 日後に眼下静脈より採血し、抗 BSA 抗体価を ELISA により調べた。その結果、(5) BSA + *L. casei* subsp. *casei* + デキストラン群で特異抗体価が有意に高かった。(第 4 図参照)

＜実施例 7＞ 抗原皮下投与における細胞性免疫のデキストランによる増強

8 週齢の BALB/c 雄マウス 30 匹を 6 匹ずつ 5 群に分けた。各群は、(1) コントロール群、(2) BSA 群、(3) BSA + *L. casei* subsp. *casei* 群、

(4) B S A + デキストラン群、(5) B S A + *L. casei* subsp. *casei* + デキストラン群とした。実験開始より試験期間を通して、(1)、(2)と(3)には通常食を、(4)と(5)にはデキストランを通常食 1 k g あたり 7 5 m g 添加して与えた。試験開始より 3 日間にわたり(3)と(5)には *L. casei* subsp. *casei* をマウス 1 匹あたり 1 0 <sup>6</sup> 個経口接種した。3 日目に F I A を用いて、それぞれ、(1)には P B S + F I A、(2)～(5)には B S A 5 m g / m l + F I A をそれぞれ 1 : 1 で乳化させ、1 匹あたり 2 0 0  $\mu$  l を足蹠の皮下に投与した。3 5 日目に 3 日目と同様にして追加免疫を行い、その 5 日後、B S A を P B S に溶解し、マウス耳朶の皮内に投与し、2 4 、 4 8 、 7 2 時間後に耳朶の厚みを測定した。その結果、(5) B S A + *L. casei* subsp. *casei* + デキストラン群の耳朶の厚みが有意に増加していた。(第 5 図参照)

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、*L. casei* subsp. *casei* を隨時摂取しなくとも、*L. casei* subsp. *casei* をヒトや動物等の腸内で選択的に発育増殖・定着させることで、また腸内に常在する *L. casei* subsp. *casei* を腸内で選択的に発育増殖させることで、*L. casei* subsp. *casei* 由来の種々の生物学的活性を生体内で持続させることができる。

## 請求の範囲

1. ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを選択的に増殖させるための、デキストランを含む菌増殖促進用組成物。
2. さらに、ラクトバシラス・カゼイ 亜種 カゼイを含む請求項1に記載の菌増殖促進用組成物。
3. デキストランの分子量が2,000～4,000万である請求項1に記載の菌増殖促進用組成物。
4. 請求項1～3のいずれか一項に記載の菌増殖促進用組成物を含む医薬組成物。
5. 請求項1～3のいずれか一項に記載の菌増殖促進用組成物を含む健康用食品。
6. 請求項1～3のいずれか一項に記載の菌増殖促進用組成物を含む飼料。

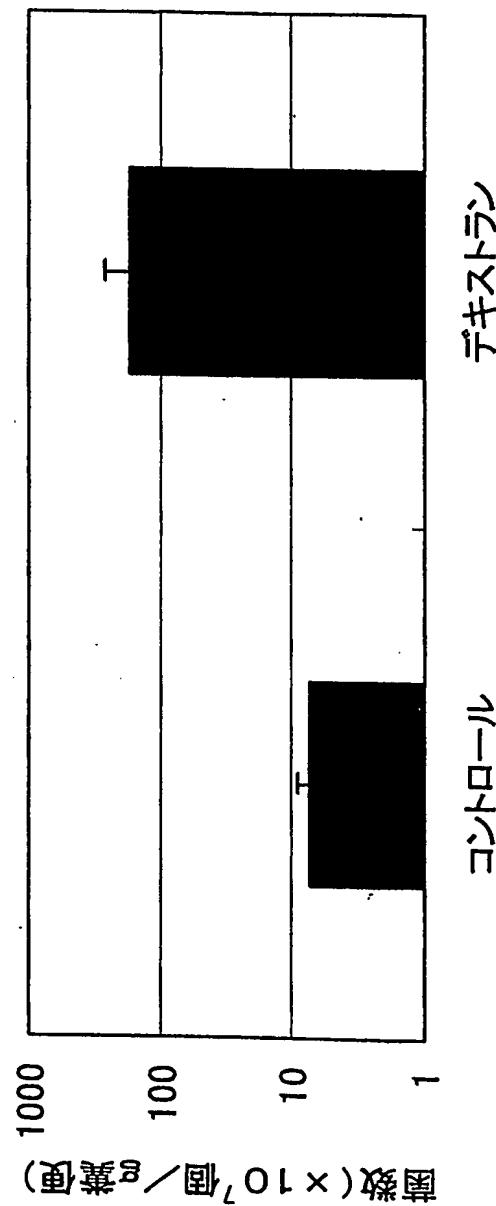


Fig. 1

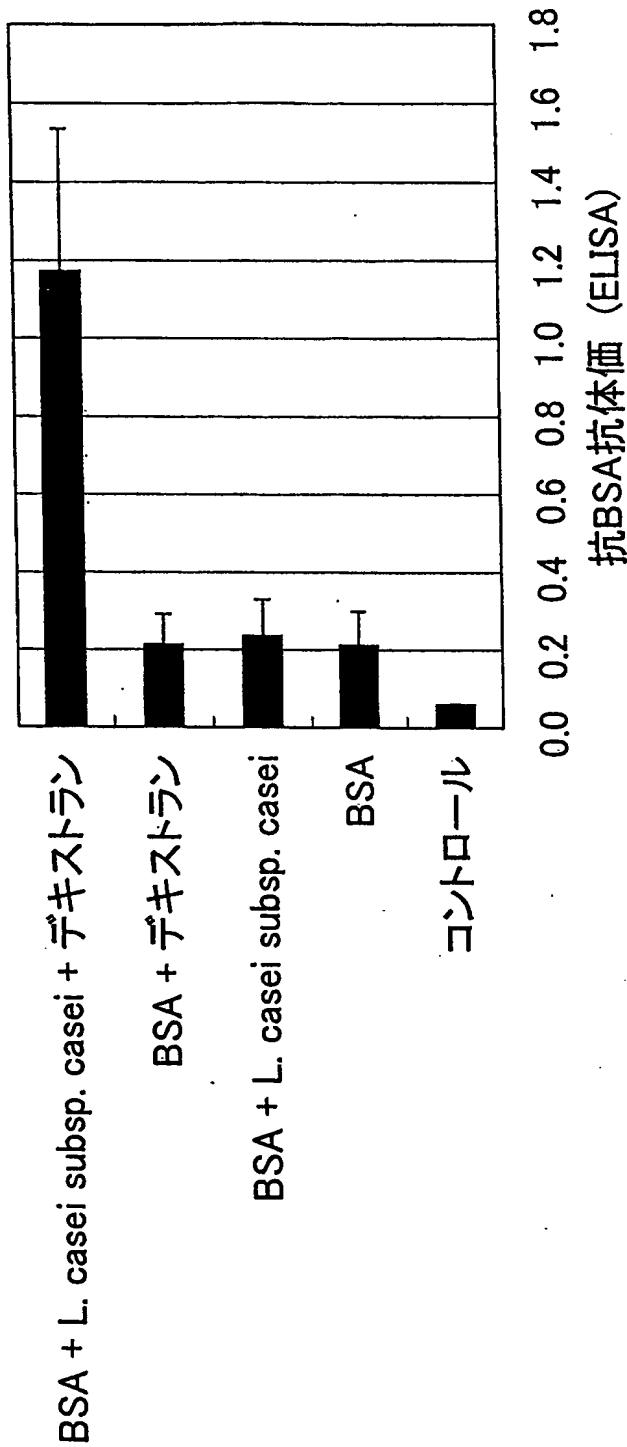


Fig. 2

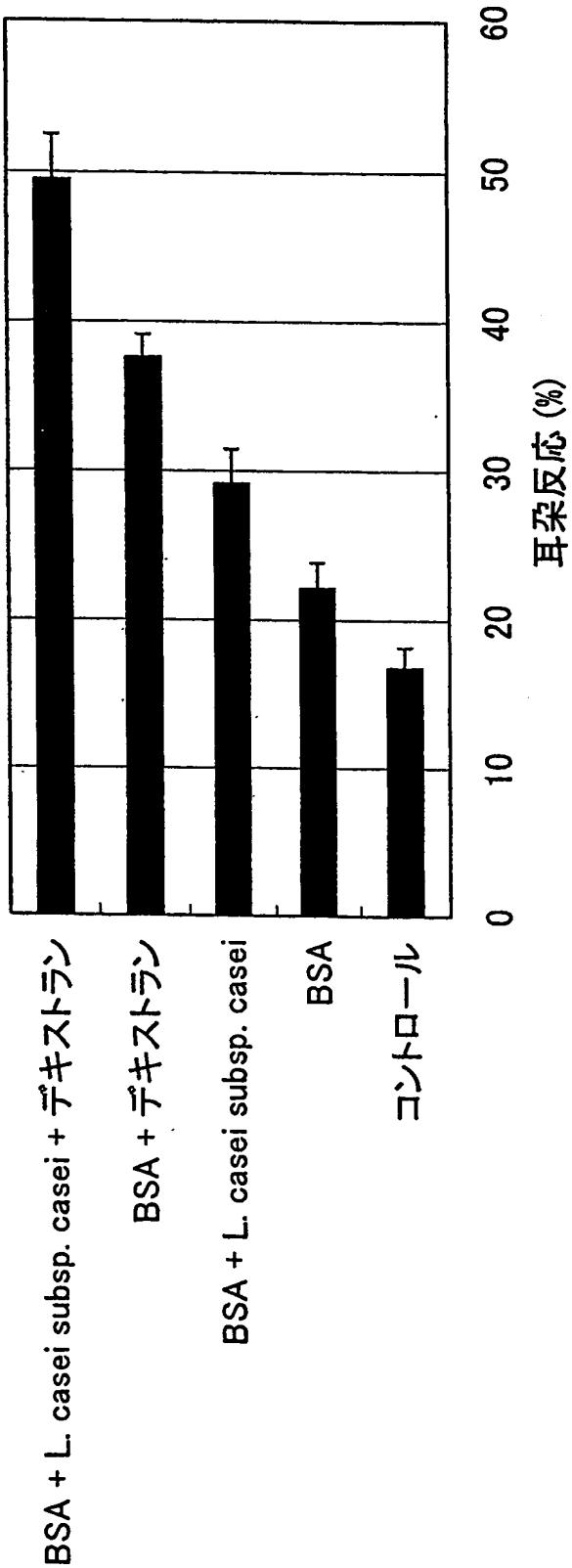


Fig. 3

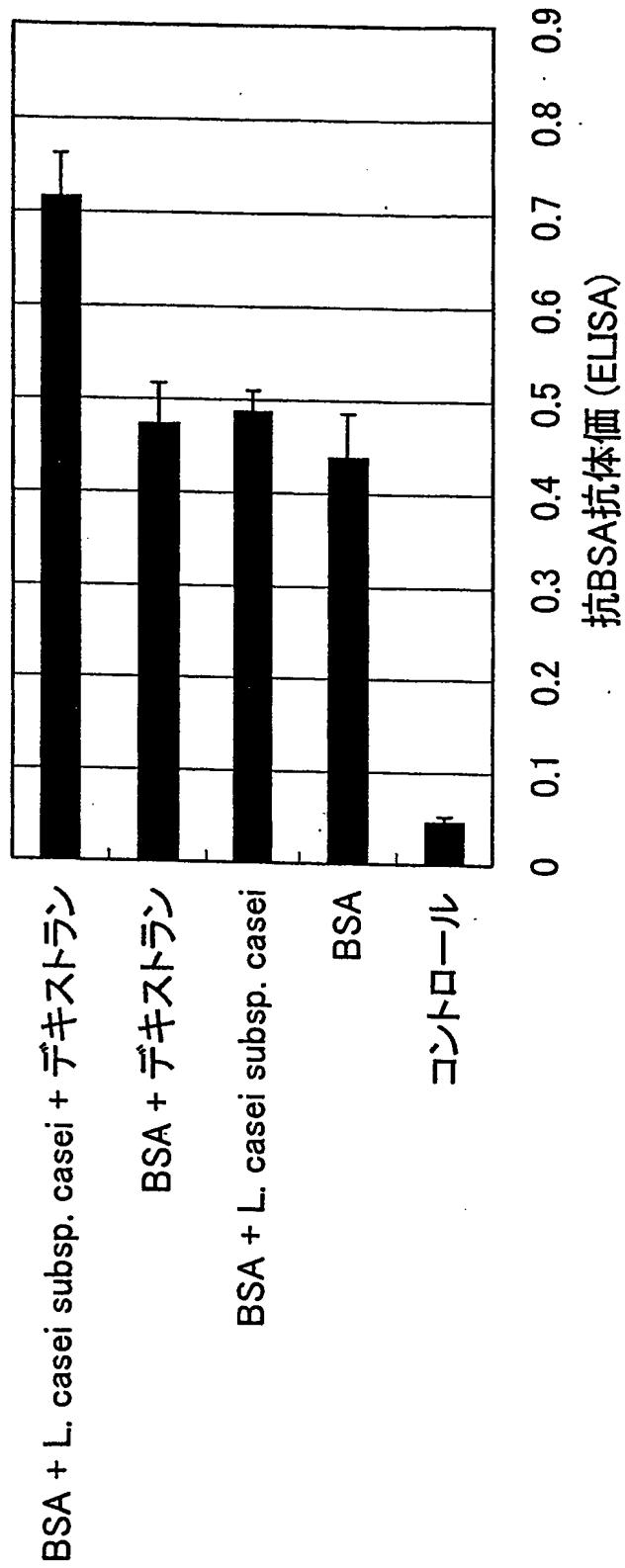


Fig. 4

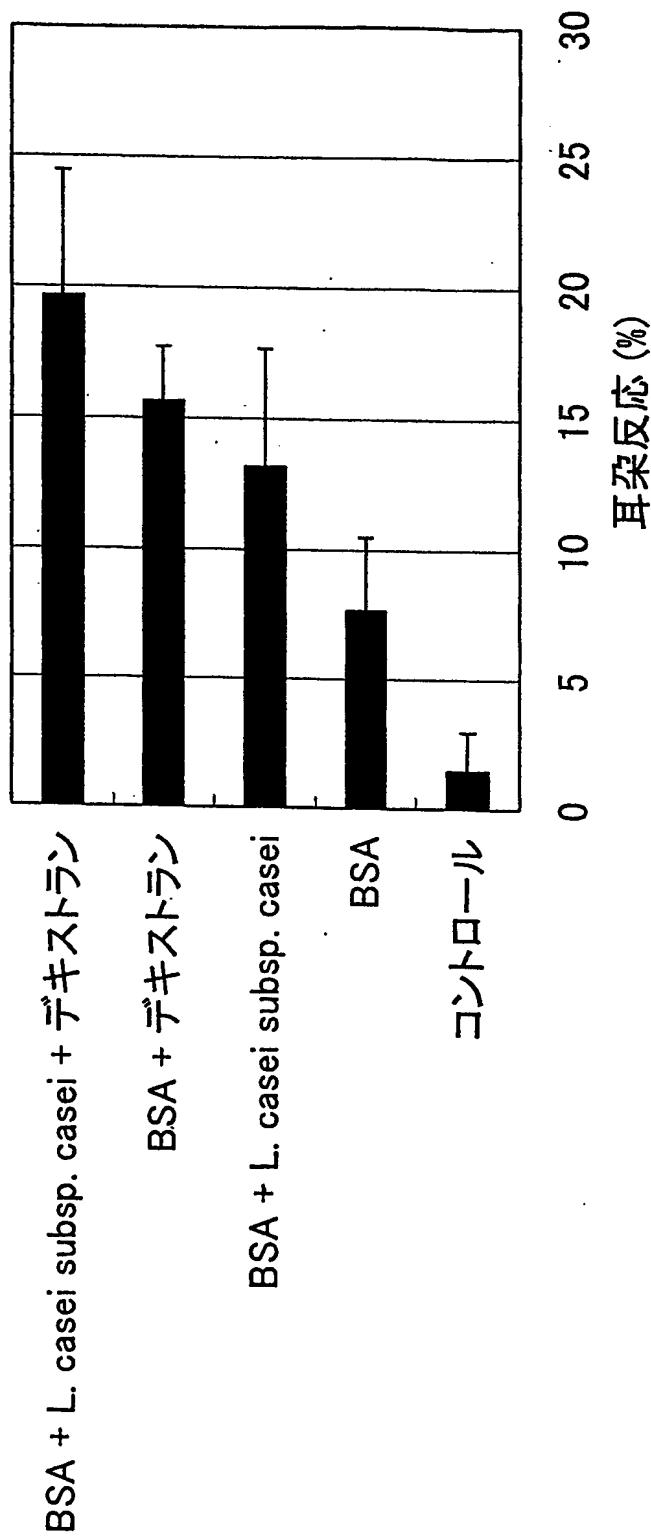


Fig. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09272

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N1/20, A23K1/16, A23L1/30, A61K35/74, A61K47/36, A61P1/00, A61P1/04, A61P1/10, A61P1/14, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/06, A61P9/12, A61P13/02, A61P29/00, A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N1/20, A23K1/16, A23L1/30, A61K35/74, A61K47/36, A61P1/00, A61P1/04, A61P1/10, A61P1/14, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/06, A61P9/12, A61P13/02, A61P29/00, A61P31/00,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/ DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | EP 382355 A (HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU),<br>16 August, 1990 (16.08.90),<br>Full text<br>& CA 2007270 A & JP 2-289520 A<br>& TW 221828 A & DE 69031285 E | 1-6                   |
| X         | JP 2000-270784 A (Meito Sangyo Co., Ltd. et al.),<br>03 January, 2000 (03.01.00),<br>Full text<br>(Family: none)  | 1-6                   |
| X         | JP 2001-269125 A (Meito Sangyo Co., Ltd.),<br>02 October, 2001 (02.10.01),<br>Full text<br>(Family: none)   | 1-6                   |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 August, 2003 (22.08.03)

Date of mailing of the international search report  
09 September, 2003 (09.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09272

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | EP 726272 A2 (HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU),<br>14 August, 1996 (14.08.96),<br>Full text<br>& JP 8-214871 A & JP 8-214895 A<br>& JP 8-217784 A & EP 726272 A3  | 1-6                   |
| P,X       | Tomohiko OGAWA et al., "Dextran Tokui Shikasei Nyusankin o Mochiita Synbiotics ni yoru Keiko-teki Men'eki Zokyo Sayo", Japanese journal of bacteriology, Vol.58, No.1, 28 February, 2003 (28.02.03) | 1-6                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/09272

**Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
(International Patent Classification (IPC))Int.Cl<sup>7</sup> A61P31/18, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04, A61P37/08,  
A61P39/06, A61P43/00//C12N1/38(According to International Patent Classification (IPC) or to both  
national classification and IPC)**Continuation of B. FIELDS SEARCHED**

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61P31/18, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04, A61P37/08,  
A61P39/06, A61P43/00//C12N1/38Minimum documentation searched (classification system followed by  
classification symbols)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' C12N 1/20, A23K 1/16, A23L 1/30, A61K 35/74, A61K 47/36, A61P 1/00, A61P 1/04, A61P 1/10, A61P 1/14, A61P 1/16, A61P 3/00, A61P 3/06, A61P 9/12, A61P 13/02, A61P 29/00, A61P 31/00, A61P 31/18, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 37/04, A61P 37/08, A61P 39/06, A61P 43/00//C12N 1/38

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' C12N 1/20, A23K 1/16, A23L 1/30, A61K 35/74, A61K 47/36, A61P 1/00, A61P 1/04, A61P 1/10, A61P 1/14, A61P 1/16, A61P 3/00, A61P 3/06, A61P 9/12, A61P 13/02, A61P 29/00, A61P 31/00, A61P 31/18, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 37/04, A61P 37/08, A61P 39/06, A61P 43/00//C12N 1/38

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTPlus(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X               | EP 382355 A (HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU) 1990. 08. 16, 全文<br>& CA 2007270 A & JP 2-289520 A & TW 221828 A & DE 69031285 E | 1-6              |
| X               | JP 2000-270784 A (名糖産業株式会社他) 2000. 01. 03, 全文<br>(ファミリーなし)   | 1-6              |
| X               | JP 2001-269125 A (名糖産業株式会社他) 2001. 10. 02, 全文<br>(ファミリーなし)   | 1-6              |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

22. 08. 03

## 国際調査報告の発送日

09. 09. 03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

長井 啓子

4N 3038



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) 関連すると認められる文献 |  |                  |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*     | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| X                   | EP 726272 A2 (HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU) 1996. 08. 14, 全文<br>& JP 8-214871 A & JP 8-214895 A & JP 8-217784 A<br>& EP 726272 A3 | 1-6              |
| P, X                | 小川知彦他、デキストラン特異資化性乳酸菌を用いたシンバイオティクスによる傾向的免疫増強作用、日本細菌学雑誌、<br>第58巻第1号 (2003. 02. 28)   | 1-6              |